

PEMEKATAN ENZIM SELULASE *Penicillium sp.* LBKURCC20 DENGAN PENGENDAPAN AMONIUM SULFAT 80% JENUH

Masdalena Sinaga, Titania T. Nugroho, Andi Dahliaty

**Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Biokimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
*masdalenasinaga@gmail.com***

ABSTRACT

Cellulase enzyme activity of *Penicillium sp.* LBKURCC20 Isolate of Riau can be increased by concentrating the enzyme using 80% saturated solid ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anhydrous. Precipitated enzyme was redissolved by the addition of acetate buffer solution pH 5.5 to 1/70 times its original volume. Cellulase enzyme activity was determined using substrates CMC and avicel. CMCase and avicelase enzyme activity of the crude enzyme was (0.0164 ± 0.0036) U/mL and (0.003 ± 0.0025) U/mL, respectively. CMCase and avicelase enzyme activity after concentration was (0.219 ± 0.0579) U/mL and (0.03 ± 0.03) U/mL, respectively. The test results showed that the activity of concentrated CMCase increased 13.5 times and avicelase enzyme activity increased 10 times after concentrating.

Keywords: *Penicillium sp.*, cellulase, ammonium sulfate

ABSTRAK

Enzim selulase *Penicillium sp.* LBKURCC20 dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan pemekatan menggunakan metode pengkaraman amonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 80% jenuh. Enzim yang terendapkan dilarutkan kembali dengan penambahan larutan buffer asetat pH 5,5 hingga 1/70 kali volume semula. Aktivitas enzim selulase ditentukan menggunakan substrat CMC dan avisel. Aktivitas ekstrak kasar enzim CMCase dan aviselase masing-masing sebesar $(0,0164 \pm 0,0036)$ U/mL dan $(0,003 \pm 0,0025)$ U/mL. Aktivitas enzim CMCase dan aviselase setelah pemekatan masing-masing sebesar $(0,219 \pm 0,0579)$ U/mL dan $(0,03 \pm 0,03)$ U/mL Hasil pengujian menunjukkan aktivitas enzim CMCase pekat meningkat sebesar 13,5 kali dan aktivitas enzim aviselase meningkat sebesar 10 kali setelah pemekatan.

Kata kunci: *Penicillium sp.*, selulase, ammonium sulfat.

PENDAHULUAN

Penicillium sp. merupakan fungi yang banyak digunakan pada produksi enzim selulase. *Fungi* ini mampu menghasilkan enzim endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase dalam jumlah besar. Pertumbuhan *Fungi Penicillium* dipengaruhi oleh ketersediaan sumber nitrogen dan oksigen.

Enzim selulase dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida membentuk glukosa. Selulase kompleks mengandung selobiohidrolase, endoglukanase, dan β -glukosidase. Ekso-1,4- β -D-glukanase (selobiohidrolase) dapat mendegradasi selulosa dari ujung pereduksi dan nonpereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan glukosa. Endoglukanase dapat menghidrolisis selulosa amorf sehingga menghasilkan rantai polisakarida yang lebih pendek. β -glukosidase (selobiose) akan menghidrolisis polisakarida yang pendek pada selobiosa untuk menghasilkan glukosa monosakarida (Archarya dkk., 2008).

Pemekatan enzim dapat dilakukan dengan pengendapan protein melalui penambahan garam ammonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Prinsip pengendapan protein adalah berkurangnya kelarutan protein dalam larutan karena air diserap oleh garam. Penambahan garam dilakukan dalam konsentrasi tinggi. Konsentrasi garam yang rendah meningkatkan kelarutan protein karena ion-ion berinteraksi dengan gugus bermuatan pada permukaan protein dan mengganggu dengan kekuatan elektrostatik yang kuat yang disebut proses *salting in*. Penambahan garam dalam konsentrasi tinggi menyebabkan molekul air yang semula terikat pada permukaan hidrofobik protein kemudian

berikatan dengan garam. Semakin banyak molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam mengakibatkan protein saling berinteraksi, teragregasi dan mengendap (*salting out*). Amonium sulfat memiliki daya larut yang sangat tinggi, dan garam ini paling banyak digunakan untuk fraksinasi protein-protein. Amonium sulfat yang jenuh disiapkan pada suhu ruang dengan menambahkan 767 g pada 1 liter akuades, dan ini disebut larutan saturasi 100%, dan dengan fraksinasi dinyatakan secara relatif terhadap saturasi tersebut (Bintang, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk pemekatan selulase menggunakan padatan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anhidrat 80% jenuh.

METODE PENELITIAN

Bahan hidup : Isolat *fungi Penicillium sp.* LBKURCC20 yang merupakan koleksi laboratorium Biokimia, FMIPA, Universitas Riau, yang telah diisolasi dari tanah hutan gambut biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu, Riau dan dipelihara pada media *Potato Dextrose Agar* dari penelitian terdahulu.

a. Peremajaan isolat jamur *Penicillium sp.* LBKURCC20 pada media PDA

Isolat jamur *Penicillium sp.* LBKURCC20 diambil dengan menggunakan ose secara aseptis dan diinokulasikan ke media PDA. Media PDA yang telah diinokulasikan isolat jamur *Penicillium sp.* LBKURCC20 diinkubasi pada suhu ruang selama 20 hari atau hingga spora hijau tumbuh subur.

b. Inokulasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC20 pada media cair

Spora jamur *Penicillium* sp. LBKURCC20 yang diremajakan pada media PDA dibilas dengan larutan salin steril (NaCl 0,8%) dan dilepaskan dari media dengan menggunakan ose secara aseptis. Larutan disaring menggunakan *glasswool* sehingga diperoleh suspensi *spora*. Sebagian suspensi *spora* diukur ODnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm ($OD_{660nm} = 0,34 \sim 7 \times 10^{12}$). Suspensi *spora* diinokulasikan pada media cair produksi selulase dan diinkubasi pada suhu ruang dengan pengadukan menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan putaran 150 rpm selama 96 jam.

c. Produksi enzim selulase

Produksi selulase dilakukan dengan menginokulasi 7×10^{12} *spora* dari isolat pada 25 mL media produksi. Kultur cair ini kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan pengocokan 150 rpm selama 120 jam. Selulase yang telah diproduksi dalam media produksi dipisahkan dari miselia jamur menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin pada suhu $5-10^{\circ}\text{C}$ dan kecepatan putaran 9500 rpm selama 10 menit. Filtrat disaring menggunakan kertas Whatman GF/C sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim dan disterilisasi menggunakan NalgeneTM *Sterile Disposable Bottle Top Filters* dengan membran *Poly Ether Sulfonat* (PES) $0,45 \mu\text{m}$. Ekstrak kasar enzim ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,02% dan disimpan dalam pendingin. Konsentrasi gula pereduksi ekstrak kasar enzim dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dan kadar

protein dianalisis menggunakan metode Lowry.

d. Pemekatan enzim selulase

Enzim diendapkan dari ekstrak kasar dengan penambahan padatan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anhidrat secara perlahan dalam keadaan dingin ($5-10^{\circ}\text{C}$) sambil distirer hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Larutan dibiarkan selama 30 menit sambil distirer. Endapan disentrifugasi dingin selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Endapan ditambahkan dengan larutan buffer asetat 0,05 M pH 5,5 hingga terjadi pemekatan yang diperkirakan mencapai $70\times$ volume semula. Jadi misalnya volume awal adalah 70 mL, penambahan buffer pada endapan adalah 1 mL. Enzim pekat yang diperoleh ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,02%. Konsentrasi gula pereduksi enzim selulase dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dan kadar protein dianalisis menggunakan metode Lowry.

e. Penentuan aktivitas enzim selulase

Analisis aktivitas enzim selulase dilakukan menggunakan dua macam substrat *Carboxymethylcellulose* (CMC) dan avisel. Aktivitas enzim diuji sebelum dan setelah proses pemekatan. Sebanyak 500 μL substrat CMC/avisel 2% dan diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* suhu 40°C dan aduk perlahan, selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* suhu 40°C . Aktivitas enzim dihentikan dengan penambahan 500 μL reagen Nelson-Somogyi, dihomogenkan. Tabung

dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Tambahkan 500 μ L reagen arsenomolibdat, dihomogenkan, dan diamkan selama 5 menit. Tambahkan 3 mL akuades, dihomogenkan, dan diamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada $\lambda=540$ nm.

Sebagai kontrol, tabung blanko diisi dengan 1 mL larutan buffer asetat 0,05 M pH 5,5 dan 1 mL larutan intermediet glukosa kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson-Somogyi, vortex dan panaskan dalam penangas air selama 20 menit. didinginkan hingga suhu kamar. 1 mL reagen arsenomolibdat ditambahkan pada tabung blanko, diamkan selama 5 menit. Setelah 5 menit, tambahkan 6 mL akuades untuk tabung blanko, vortex hingga tercampur sempurna lalu didiamkan selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dan dilakukan dua kali pengulangan untuk analisis. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang melepaskan 1 μ mol gula pereduksi per-menit. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (Boyer, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemekatan enzim selulase bertujuan untuk meningkatkan aktivitas dengan cara mengurangi kandungan senyawa-senyawa lain dari ekstrak kasar enzim. Pemekatan enzim menggunakan metode penggaraman dengan padatan amonium sulfat anhidrat 80% jenuh. Metode ini merupakan salah satu cara yang sederhana dan murah dan juga tidak merusak enzim. Amonium sulfat yang dilarutkan dalam air akan menyebabkan terjadinya proses *salting out* sehingga protein akan mengendap. Salting out terjadi akibat kompetisi antara ion-ion dari garam amonium dan molekul enzim dalam berinteraksi dengan molekul air. Dengan tingginya kadar ion, menyebabkan molekul protein berinteraksi dengan molekul protein lainnya sehingga membentuk endapan. Meskipun mengendap namun tidak menyebabkan struktur protein dari enzim rusak dan kehilangan aktivitasnya apabila dilakukan pada suhu (5-10) $^{\circ}$ C. Hasil uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase *Penicillium sp.* LBKURCC20 menggunakan substrat CMC ditunjukkan pada Tabel 1 dan substrat avisel pada Tabel 2.

Tabel 1: Uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase (CMCase) *Penicillium sp.* LBKURCC20.

Jamur <i>Penicillium sp.</i> LBKURCC20	Rata-rata aktivitas enzim (10^{-3} U/mL)	Kelipatan pemekatan	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Tingkat pemurnian CMCase (Endoglukanase)
Ekstrak kasar enzim	0,0164 \pm 0,0036	1 \times	0,017745	0,9242 \pm 0,9242	1
Supernatan	Tidak terdeteksi	0	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	0
Enzim selulase pekat	0,219 \pm 0,0579	13,5 \times	0,6616	0,331 \pm 0,7226	0,35

Tabel 2: Uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase (aviselase) *Penicillium sp.* LBKURCC20.

Jamur <i>Penicillium sp.</i> LBKURCC20	Rata-rata aktivitas enzim (10 ⁻³ U/mL)	Kelipatan pemekatan	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Tingkat pemurnian aviselase (Eksoglukanase)
Ekstrak kasar enzim	0,003 ± 0,0025	1x	0,017745	0,169 ± 0,2137	1
Supernatan	0,00056 ± 0,0000	0	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	0
Enzim selulase pekat	0,03 ± 0,03	10x	0,6616	0,002 ± 0,9164	0,01

Kelipatan pemekatan enzim selulase ditentukan dengan menghitung peningkatan aktivitas enzim selulase antara ekstrak kasar enzim dan enzim pekat hasil pengendapan. CMC merupakan selulosa koloidal yang berbentuk amorf. Hidrolisis CMC oleh ekstrak kasar maupun hasil pemekatan ekstrak enzim menunjukkan adanya aktivitas enzim endoglukanase. Avisel merupakan selulosa koloidal yang berbentuk mikrokristalin. Hidrolisis avisel oleh ekstrak kasar maupun hasil pemekatan ekstrak enzim menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoglukanase. Penentuan aktivitas enzim CMCase dan aviselase bertujuan untuk mengetahui jenis selulase yang terdapat pada ekstrak kasar enzim dan hasil pemekatan ekstrak enzim.

Aktivitas CMCase dan aviselase ekstrak kasar enzim dan enzim pekat (**Tabel 1 dan 2**) menunjukkan terjadi peningkatan aktivitas enzim setelah pemekatan hingga 70 kali volume yang menghasilkan kelipatan pemekatan sebesar 13,5 kali dan 10 kali. Berarti sebagian besar saat proses pemekatan terjadi denaturasi enzim, ditambah adanya pengaruh garam yang tersisa pada endapan karena tidak dilakukan dialisis.

Sepriyani (2012) melaporkan aktivitas ekstrak kasar enzim CMCase dan aviselase *Penicillium sp.*

LBKURCC20 pada suhu 40°C, pH 5,5 dan 96 jam waktu produksi, masing-masing adalah sebesar (0,0131 ± 0,0013) U/mL dan (0,0436 ± 0,0013) U/mL. Aktivitas CMCase yang diperoleh tidak berbeda jauh dari aktivitas CMCase pada penelitian sebelumnya. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan isolat *Penicillium sp.* LBKURCC20 juga memiliki aktivitas CMCase. Sedangkan Aktivitas aviselase yang diperoleh pada penelitian ini berbeda jauh dari aktivitas aviselase pada penelitian sebelumnya. Aktivitas enzim CMCase lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas aviselase. Perbedaan yang terjadi karena penelitian ini menggunakan CMC dan avisel sebagai sumber karbohidrat, sehingga *fungi* lebih cenderung menghasilkan CMCase daripada aviselase. Hal ini menunjukkan bahwa selulase *Penicillium sp.* LBKURCC20 memiliki lebih banyak endoglukanase (CMCase) daripada eksoglukanase (aviselase). Sedangkan pada penelitian sebelumnya hanya menggunakan avisel sebagai sumber karbohidrat sehingga cenderung menghasilkan aktivitas aviselase yang tinggi.

Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein. Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Kadar

protein supernatan tidak dapat ditentukan menggunakan metode Lowry, karena adanya pengaruh ion NH_4^+ pada saat proses pengendapan yang dapat mengganggu penentuan kadar protein. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan tingkat pemurnian suatu enzim, semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim, maka semakin tinggi tingkat pemurnian enzim tersebut. Aktivitas spesifik CMCase ekstrak kasar enzim adalah sebesar $(0,9242 \pm 0,9242)$ U/mg protein dan enzim selulase pekat sebesar $(0,331 \pm 0,7226)$ U/mg protein. Aktivitas spesifik aviselase ekstrak kasar enzim adalah sebesar $(0,169 \pm 0,2137)$ U/mg protein dan enzim selulase pekat sebesar $(0,002 \pm 0,9164)$ U/mg protein. Tingkat pemurnian CMCase dan aviselase yang diperoleh tidak signifikan yaitu 0,35 dan 0,01. Aktivitas spesifik menurun setelah pemekatan enzim, menunjukkan bahwa tidak terjadi pemurnian yang signifikan dari enzim.

Dalam supernatan aktivitas eksoglukanase sangat rendah dan aktivitas endoglukanase tidak terdeteksi, maka kemungkinan eksoglukanase dan endoglukanase yang mengendap pada pemekatan ammonium sulfat sebagian mengendap dan terdenaturasi atau terinhibisi oleh sedikit garam yang tersisa pada proses pelarutan kembali.

KESIMPULAN

Aktivitas CMCase enzim selulase *Penicillium sp.* LBKURCC20 meningkat hingga 13,5 kali setelah pemekatan melalui pengendapan padatan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anhidrat 80% jenuh, yaitu $(0,0164 \pm 0,0036)$ U/mL menjadi $(0,219 \pm 0,0579)$ U/mL. Aktivitas aviselase enzim selulase *Penicillium sp.* LBKURCC20 meningkat hingga 10 kali

setelah pemekatan melalui pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% jenuh, yaitu $(0,003 \pm 0,0025)$ U/mL menjadi $(0,03 \pm 0,03)$ U/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh skim penelitian Fundamental a.n. Titania T. Nugroho sebagai ketua tim peneliti dengan Dana Desentralisasi DP2M Dirjen Dikti, Kemendikbud, Lembaga Penelitian Universitas Riau, nomor kontrak 321 NN.19.2/PL/2013, DIPA-023.04.2.415.92/2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, P. B., Acharya, and Modi, H. A. 2008. Optimization for Cellulase Production by *Aspergillus niger* Using Saw Dust as Substrate. *African Journal of Biotechnology*. **22**: 4147-4152.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga, Jakarta.
- Boyer, R. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. 3rd ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Sepriyani, H. 2012. Isolasi *Fungi* Aviselitik dan Selulolitik Dari Tanah Hutan Sekunder Area Sundak Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu, Riau. *Tesis*. FMIPA-UR, Pekanbaru.